

**Über das Ferment-erhöhende Virus
aus Laboratoriumsgeschwülsten der Maus
(Riley-Virus): III. Virusinaktivierung
durch Kälte, Hitze,
Formol und Natriumdesoxycholat
(4 Tabellen und 1 Abbildung)**

Klaus Prectel

1965

**Über das Ferment-erhöhende Virus
aus Laboratoriumsgeschwülsten der Maus
(Riley-Virus): III. Virusinaktivierung
durch Kälte, Hitze,
Formol und Natriumdesoxycholat
(4 Tabellen und 1 Abbildung)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Klaus Prechtel
aus Augsburg

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. -Doz. Dr. A. GEORGI
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. BÜNGELER
Dekan:	Prof. Dr. O. HUG

Tag der mündlichen Prüfung: 6.4.1965



I N H A L T

- A. Einleitung
- B. Material und Methode: grundsätzliche Angaben für alle durchgeführten Experimente
- C. Konservierung des Riley-Virus in der Kälte und Beeinflussung des Infektionstiters durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen
(Versuche 1-4)
- D. Virusinaktivierung durch thermische Einflüsse
(Versuch 5)
- E. Virusinaktivierung durch Einwirkung chemischer Substanzen;
Formol und Natriumdesoxycholat
(Versuche 6-7)
- F. Zusammenfassende Besprechung der Ergebnisse
- G. Literaturverzeichnis

Die Untersuchungen wurden mit Sachbeihilfe und Geräten der Deutschen Forschungsgemeinschaft Ge 121/2 und Ge 121/3 durchgeführt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555206_0056

A. EINLEITUNG

In Impfgeschwülsten und bei virusinduzierten Leukämien der Maus wurde von Riley (1960) und später von anderen (ADAMS et al. 1, FRIEND et al. 7, GEORGII et al. 10, HILL et al. 18, NOTKINS et al. 24) ein Virus gefunden, das nach Infektion von Mäusen einen fortwährenden Anstieg der Lactatdehydrogenase (LDH) im Blutserum auf etwa fünffache Normwerte verursacht. Auch andere Serumfermente, wie Isocitratdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Glutamatoxalacetattransaminase und Phosphohexoisomerase werden erhöht (BAYERLE et al. 2, BLANCHER et al. 4, MAHY et al. 22, NOTKINS et al. 25, PLAGEMANN et al. 26). Der Beweis für seine Virusnatur liegt in seiner zellfreien, beliebig wiederholbaren Übertragbarkeit, der damit nachgewiesenen Vermehrung in der Maus und anderen Eigenschaften (GEORGII et al. 10, NOTKINS et al. 24). Nach der Infektion mit dem Virus erfolgt eine nach zwei Tagen einsetzende und ständig nachweisbare Erhöhung der LDH im Serum, die über das ganze Leben des infizierten Tieres anhält (GEORGII et al. 9, ROWSON et al. 33). Seit der auch elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Virusnatur (BLADEN et al. 3) wird es als LDH-Virus oder Riley-Virus bezeichnet.

Viren sind zumeist Gruppen ähnlich reagierender mikrobieller Partikel, die in oft sehr zahlreichen Untergruppen oder Linien bzw. Stämme zu unterteilen sind. Untersuchungsverfahren müssen auf das entsprechende Virus und auf sein Wirtsgewebe abgestellt sein, weil es keine allgemeinen und unter allen denkbaren Bedingungen gültigen Eigenschaften des Verhaltens bei physikalischen oder chemischen Einwirkungen gibt. Das Verhalten hängt nicht nur von der Art des Virus, sondern auch von der Natur des einzelnen Virusstammes und darüber hinaus von den Milieubedingungen ab, unter denen ein Virus einer bestimmten Noxe ausgesetzt ist (HAAS et al. 15).

In der vorliegenden Arbeit wurde neben physikalischen und chemischen Einwirkungen besonders die Stabilität des Riley-Virus für die Temperaturbereiche untersucht, die vor allem für den Umgang mit dem Virus in üblichen Laboratorien von Interesse sind.

Anlaß hierzu war, daß wir bei Untersuchungen über den Infektionstiter des Riley-Virus eine erhebliche Abschwächung der Virusaktivität durch wiederholtes Einfrieren fanden.

Bei vielen experimentellen Fragestellungen ist jedoch eine Kältekonservierung des Virus erforderlich. In der vorliegenden Arbeit sind wir dieser Frage nachgegangen und haben vor allem untersucht, inwieweit sich mehrmaliges Einfrieren und Auftauen des in den handelsüblichen Gefriertruhen bei -20°C bis -30°C konservierten Riley-Virus auf den Infektionstiter, gemessen an der Serum-LDH, auswirkt. Weitere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Möglichkeit, das Riley-Virus zu inaktivieren und Mäuse gegen das Virus zu immunisieren.

B. MATERIAL UND METHODE

Virus

Das LDH-erhöhende Virus (Riley-Virus) stammt aus dem Mäuseimpftumor Landschütz-Sarkom Sa I (LÖBLICH et al. 21). Der Tumor war 1952 als ein retroperitoneales Retothelsarkom der Maus spontan entstanden und konnte erfolgreich auf Mäusen transplantiert werden. Der Tumor wird seit etwa 9 Jahren am Pathologischen Institut der Universität München auf weißen Mäusen gezüchtet (Inzucht AB- bzw. Swiss-Mäuse NMRI/Hannover). Dazu wird in der Regel am achten Tag der Tumoraszites einer Maus auf mehrere Tiere intraperitoneal (0,5 ccm) übertragen.

Folgende Viruslösungen wurden für unsere Untersuchungen hergestellt und bei -24°C konserviert.

a) Nativ eingefrorener Ascites: später wurde die Tumorflißigkeit mit farbloser Hanks-Lösung im Verhältnis 1:10 versetzt, kurze Zeit homogenisiert, je 40 Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$ inkubiert und bei 4500 U/min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde durch einen Schott-G 4 bzw. G 5 Glasfilter filtriert. Von diesem Filtrat wurden zehnfache Verdünnungsreihen (als Verdünnungslösung diente farblose Hanks'sche Salzlösung, pH 6,6 - 6,9) hergestellt.

b) Zellfreie Viruslösung 1:4 verdünnt: Tumoraszites von Landschütz-Sarkom wurde nach seiner Entnahme mit Hanks-Lösung 1:4 verdünnt und dann, wie unter a) beschrieben, homogenisiert, zentrifugiert und der zellfreie Überstand durch einen Seitzfilter gepreßt. Das Filtrat wurde eingefroren.

c) Zellfreie Virus-Lösungen in logarithmischen Verdünnungen: Von einem Teil der unter b) beschriebenen Virus-Lösung wurden sofort mit Hanks-Lösung logarithmische Verdünnungsreihen hergestellt und eingefroren.

d) Nativ eingefrorene Organe: Die Leber und Milz virusinfizierter Mäuse wurde später folgendermaßen aufgearbeitet: Leber- und Milzgewebe (ca. 2 g), mit der Schere zerkleinert, wurden mit 15 ml Hanks-Lösung versetzt und homogenisiert. Das Homogenat wurde nach 40 Minuten Inkubations-

zeit bei + 4°C 45 Minuten lang bei 4500 U/min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde durch einen Schott-G 4 bzw. G 5 Glasfilter filtriert. Von diesem Filtrat wurden mit Hanks-Lösung logarithmische Verdünnungsreihen hergestellt.

Der zellfreie Überstand wurde nach Aufbearbeitung des unter a) beschriebenen nativen Tumorcites und der unter d) beschriebenen Organe Leber und Milz durch einen Schott-G 5 Glasfilter filtriert. Abweichend davon wurden die unter b) und c) beschriebenen, mit Hanks'scher Salzlösung verdünnten Virus-Lösungen vor ihrer Aufbearbeitung bereits durch einen Seitz-Filter gepreßt. Die unterschiedliche Handhabung mußte vorgenommen werden, da die kleinen Mengen des nativen Tumorcites und der Organaufbereitungen nicht ohne erheblichen quantitativen Verlust durch den Seitz-Filter gepreßt werden konnten. Die Viruslösungen bzw. die Organe wurden einheitlich in einem Wasserbad bei +37°C aufgetaut.

Versuchsmäuse

Ausgewachsene weiße Mäuse, im Mittel 35 g schwer, die teils aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover, teils aus der Zuchtanstalt WIGA (Swiss-Mäuse; NMRI/Gassner) stammten. Die Tiere wurden bis zur Verwendung für Versuchszwecke in einem eigenen Stallraum entweder in Gitterkäfigen zu durchschnittlich 30 Stück oder in Plastik Käfigen zu je 6 Stück, getrennt nach Geschlechtern, gehalten. Ernährt wurden die Tiere mit Diätnahrung für Versuchstiere in Preßform (Murilan); Wasser wurde durch Saugflaschen zugeführt. Mindestens zwei Wochen vor Verwendung für Versuchszwecke wurden die Tiere gegen Ektromelie-Virus vacciniert (0,1 ml intraperitoneal Vaccine-Virus aus der Bayerischen Landesimpfanstalt). Das Vaccine-Virus beeinflusst die Serum-LDH der Mäuse nicht. Während der Versuchsdauer wurden die Tiere in einem Experimentierraum in kleinen Plastik Käfigen zu je drei Stück gehalten.

Virusnachweis

Das Riley-Virus wird durch seine fünffache Steigerung der Serum-LDH nachgewiesen (GEORGII et al. 7). Nach einmaliger Infektion erfolgt eine nach zwei Tagen einsetzende und ständig nachweisbare Erhöhung der LDH, die nicht mit der Infektiosität bzw. Virulenz des Virus gleichzusetzen ist. Der Mittelwert der LDH im Serum weißer Mäuse beträgt 20 Bücher-Einheiten (BüE) pro ml Serum. Als positiver Virusnachweis galten Werte über 65 BüE, wenn sie in gleicher Höhe wenigstens über Wochen erhalten blieben. Jeweils fünf Tage nach der Infektion wurde die Lactatdehydrogenase bestimmt. Auf die Bestimmung

des ID₅₀ - Infektionstiters (Reed und Muench) konnte verzichtet werden, da die Werte einheitlich innerhalb einer Zehnerpotenz unter die von uns festgelegte Grenze der Infektiosität (65 BÜE) abfielen.

Fermentbestimmung

Durchschnittlich alle fünf Tage nach der intraperitoneal gesetzten Infektion wurde von den Tieren durch Punktion des retrobulbären Venenplexus Blut gewonnen. Den mit Narkoseäther betäubten Tieren wurde mit Glaspipetten, die ein Lumen von etwa 0,35 mm haben, ca. 0,4 ml Blut entnommen. Nachdem das Blut 20 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert worden war, wurde aus dem überstehendem Serum das LDH-Ferment durch den DPN-H Test im UV-Spektrophotometer (Eppendorf) bestimmt und in Bücher-Einheiten, bezogen auf 1 ml Serum, gemessen.

Immunisierung

Wir gingen von der Vorstellung aus, daß das Riley-Virus bei weißen Mäusen antigene Eigenschaften gegen die LDH-erhöhende Komponente hervorrufen könnte. Deshalb inaktivierten wir das Virus durch Hitze, Formol und Natriumdesoxycholat. Das auf diesen drei Wegen inaktivierte Virus inokulierten wir innerhalb 70 Tagen dreimal (zweite Inokulation nach 21, dritte Inokulation nach 70 Tagen) den einzelnen Mäusegruppen. Nach weiteren 30 Tagen infizierten wir die Tiere mit aktivem Riley-Virus. An Hand der LDH-Werte im Serum wollten wir Rückschlüsse auf antigene Eigenschaften erzielen.

C. KONSERVIERUNG DES RILEY-VIRUS IN DER KÄLTE UND BEEINFLUSSUNG DES INFEKTIONSTITERS DURCH MEHRMALIGES EINFRIEREN UND AUFTAUEN

Die Wirkung von wiederholtem Einfrieren und Auftauen wurde am infektiösen Titer des Riley-Virus festgelegt. Vier verschiedene Lösungen des Riley-Virus wurden dabei verwendet und sind nachfolgend in vier Versuchen niedergelegt. Einmal wurde der native Ascites, zum anderen das virushaltige Filtrat, zum dritten dessen Verdünnungen (logarithmische Verdünnungsreihen) und schließlich wurden die Organe Leber und Milz der virusinfizierten Mäuse dem wiederholten Einfrieren und Auftauen unterworfen.

Riley-Virus im Tumorascites (Versuch 1)

Ausgangsmaterial war eine Ascitesflüssigkeit von Landschütz-Sarkom, die drei Monate bei -24°C bakteriologisch steril in der Gefriertruhe konserviert war. Durchschnittlich alle zehn Tage wurde der Tumor in einem Wasserbad bei $+37^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und knapp eine Stunde bei Zimmertemperatur gehalten, um dann wieder eingefroren zu werden. Eine kleine Menge des Tumors wurde vor der ersten Kältekonservierung und nach jedem Auftauen abgezweigt. Es wurde von der abgezweigten Menge eine logarithmische Verdünnungsreihe hergestellt. Anfangs wurde bis 10^{20} verdünnt. Als Verdünnungslösung diente sterile farblose Hanks-Lösung mit einem pH 6,6 - 6,9. Die Verdünnungsstufen konnten später den Versuchsergebnissen entsprechend reduziert werden. Das Ausgangsmaterial und die Verdünnungsreihen wurden je drei Mäusen (0,5 ml i. p.) injiziert. Vier bzw. fünf Tage nach der Infektion wurde die LDH im Serum der Mäuse bestimmt. Zur Kontrolle wurden die Fermentwerte virusfreier, sowie mit dem Lösungsmittel beimpfter Mäuse genommen.

Wie Tabelle 1 und Abbildung 1 zeigen, fiel der Infektionstiter nach einmaligen Einfrieren um fünf Zehnerpotenzen von 10^{15} auf 10^{10} ab; danach blieb der Titer bei sieben weiteren Einfrier-Auftau-Zyklen konstant in gleicher Höhe.

Riley-Virus in 1:4 verdünnter Salzlösung (Versuch 2)

In einem zweiten Versuch wurde zellfreie, 1:4 verdünnte Viruslösung (Herstellung siehe Methodik, b) verwendet. Das virushaltige Filtrat wurde wie im Versuch 1 auf Mäuse übertragen. Auf der Tabelle 2 und Abbildung 1 ist der eindeutige Abfall des Infektionstiters um drei Zehnerpotenzen von 10^8 auf 10^5 nach dem ersten Einfrieren des nativen verdünnten Virus zu sehen. Nach dem zweiten bis fünften Einfrieren erfolgte jeweils ein Abfall um eine Zehnerpotenz. Der Infektionstiter 10^2 blieb dann über sechs weitere Einfrier-Auftau-Zyklen erhalten. Nach zehnmaligen Einfrieren auf -24°C war nur mehr die unverdünnte Viruslösung im Tierversuch wirksam.

Riley-Virus in zehnfachen Verdünnungen der Salzlösung (Versuch 3)

In einem weiteren Versuch wurde das Riley-Virus mit Hanks-Lösung 1:4 verdünnt, Seitz filtriert und davon wurden logarithmische Verdünnungsreihen hergestellt; sie wurden in zugedruckten Erlenmeyerkolben bis zu vier Monate bei -24°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Durchschnittlich alle zwei Wochen wurden die Lösungen, wie in Versuch 1 beschrieben, aufgetaut und dann wieder eingefroren. Nach jedem Auftauen wurde von den Verdünnungsreihen etwas Viruslösung zur Infektion von Mäusen entnommen. Die Infektion von Mäusegruppen mit den zehnfachen Virusverdünnungen ergab den Infektionstiter.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 in Absolutwerten der LDH-Aktivität dargestellt. Bereits nach dem ersten Einfrieren fiel der Infektionstiter um drei Zehnerpotenzen von 10^8 auf 10^5 ab. Nach viermaligen Einfrieren war nur noch in der zehnfach verdünnten Lösung aktives Virus enthalten. Nach siebenmaligen Einfrieren war die LDH-erhöhende Komponente in allen Verdünnungsstufen aufgehoben worden.

Riley-Virus in Organen (Versuch 4)

In einem vierten Versuch wurden Leber und Milz von Mäusen mit der Impfgeschwulst Sa I konserviert. Zehn Tage nach Infektion mit dem Riley-Virus wurden die Tiere getötet und die Organe Leber und Milz eines jeden Tieres in kleinen Plastikbeuteln bei -24°C in der Tiefkühltruhe konserviert. Allwöchentlich wurden die Organe ziemlich rasch bei $+37^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und knapp eine Stunde bei Zimmertemperatur gehalten, ehe sie wieder eingefroren wurden. Dabei wurden jedesmal Stücke von Leber und Milz entnommen und, wie unter Methodik beschrieben, aufbereitet. Die aus dem Filtrat hergestellten

Verdünnungsstufen wurden wie in den vorhergehenden Versuchen je drei Mäusen (0,5 ml i. p.) inokuliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und Abbildung 1 dargestellt. Nach dem ersten Einfrieren erfolgte eine Infektionsabschwächung um drei Zehnerpotenzen von 10^{12} auf 10^9 , nach dem zweiten Einfrieren um weitere vier Zehnerpotenzen. Dann hielt sich der Infektionstiter von 10^5 über sieben fortlaufende Einfrier-Auftau-Zyklen.

Diskussion

Es sollte untersucht werden, wie sich Riley-Virus gegenüber einer oder wiederholten Temperatursenkungen auf -24°C verhält. Literaturangaben berichten, daß sich das Virus bei Temperaturen unter -20°C ohne Veränderung seiner Wirkung konservieren läßt. (GEORGII et al. 9). Genaue Untersuchungen über die Infektiosität derart aufbewahrten Virus gibt es nicht.

Wir untersuchten das Verhalten von Riley-Virus gegenüber Kälte in denjenigen Lösungsformen, die für experimentelle Versuche am häufigsten verwendet werden. Erstens im nativen Tumorcites (Versuch 1), zweitens in 1:4 verdünnter Virus-Hanks-Lösung (Versuch 2), drittens in logarithmischen Verdünnungsreihen der vorhergehenden Viruslösung (Versuch 3) und viertens in den erhaltenen Organen Leber und Milz infizierter Mäuse konserviertes Virus. Diese vier virushaltigen Substrate wurden einheitlich bei -24°C in der Tiefkühltruhe eingefroren und in einem Wasserbad bei $+37^{\circ}\text{C}$ aufgetaut.

Die Ergebnisse zeigen, daß einmalige Temperatursenkung auf -24°C den Ausgangsinfektionstiter des nativen Tumorcites von 10^{15} um fünf Zehnerpotenzen reduziert (Abbildung 1 bzw. Tabelle 1). Weitere wiederholte Temperatursenkungen bis siebenmal beeinträchtigen den Titer nicht mehr. Bei der Kältekonservierung der zweiten Gruppe (Hanks'-sche Salzlösung 1:4 verdünnte Viruslösung) fiel der Infektionstiter nach einmaligen Einfrieren um drei Zehnerpotenzen von 10^8 auf 10^5 ab; weitere fünf Einfrier-Auftau-Zyklen reduzierten den Titer auf 10^3 . Die folgenden fünf Zyklen ließen die Infektiosität unbeeinflusst. Dann war über zwei Zyklen hinweg nur noch das Ausgangsmaterial infektiös (Abbildung 1 bzw. Tabelle 2). Der Infektionstiter der logarithmischen Verdünnungsreihen, die aus der Viruslösung 2 hergestellt waren, fiel bei fünfmaligen Einfrieren bzw. Auftauen jeweils um eine bzw. zwei Zehnerpotenzen ab. Die erste Verdünnungsstufe (10^1) konnte dann noch dreimal eingefroren werden, ehe die Infektiosität aufgehoben war (Abbildung 1 bzw. Tabelle 3). Nach einmaligen Einfrieren der LDH-Virus enthaltenen Organe Leber und Milz wurde der Infektionstiter um drei Zehnerpotenzen von 10^{12} auf 10^9 reduziert; nochmaliges Einfrieren reduzierte den Titer um weitere vier Zehnerpotenzen. Dann blieb der Infektionstiter von 10^5 über sieben Einfrier-Auftau-Zyklen erhalten (Abbildung 1

bzw. Tabelle 4).

Vergleicht man die Ergebnisse, so ergibt sich, daß der Infektionstiter des Riley-Virus bei den vier Aufbewahrungsmethoden durch das erstmalige Einfrieren in jedem Fall um drei bzw. fünf Zehnerpotenzen herabgesetzt wird. Wichtige Unterschiede im Verhalten der Viruslösungen ergeben sich erst nach mehrmaligen Einfrieren, während, wie oben ausgeführt, nach einmaliger Kältekonservierung der Infektiositätsverlust etwa gleich hoch ist. Das im Tumor oder in den Organen eingefrorene Virus läßt sich nun wiederholt, siebenmal, einfrieren und auftauen, ohne weiter an Infektiosität zu verlieren. Demgegenüber verliert beim zweiten bis siebten Einfrier-Auftau-Zyklus das verdünnte, wässrig gelöste Virus jedesmal wenigstens eine Zehnerpotenz seiner Infektiosität.

Weiter ist bemerkenswert, daß trotz unterschiedlich hoher Ausgangstiters (Abbildung 1) zunächst gleiche Reaktionen erfolgen; die Kurven in Abbildung 1 verlaufen daher auf unterschiedlichem Niveau etwa parallel. Erst nach zweimaligen Einfrieren tritt ein Unterschied insofern auf, als der Infektionstiter bei Konservierung des nativen Tumorcites und der Organe über sieben Zyklen erhalten bleibt, während er bei den Verdünnungslösungen fortlaufend abgeschwächt wird.

Unsere Ergebnisse bedeuten, daß bei den hier durchgeführten Versuchsmethoden das Einfrieren des Riley-Virus auf -24°C nicht ohne Abschwächung des Infektionstiters bleibt. Unter den hier untersuchten Lösungen des Virus ist der native Tumorcites die beste Konservierungsform für Riley-Virus. Für die Erklärung unserer Befunde ergeben sich folgende Überlegungen. Bei verdünnten Viruslösungen kommt es in stärkerem Maße zu Eiskristallbildungen und zum Ablauf fermentativer Prozesse, weil in wässrigen Verdünnungen mehr Eiskristalle entstehen. Diese Vorgänge können erst dann ausgeschaltet werden, wenn der eutektische Punkt, d.h. die tiefstmögliche Gefrierpunkterniedrigung einer Lösung unterschritten wird. Dazu sind Temperaturen unter -76°C notwendig (DÖHNER et al. 6, MORGAN et al. 23, VEEN et al. 37). Wird der eutektische Punkt nicht erreicht, kommt es zu einem lokalen Auftauen einzelner Kristalle, die dann einen schädigenden Einfluß auf das Virus ausüben können. Weiterhin verhindern im allgemeinen sog. Schutzkolloide, wie Serum, Glycerin, oder Zucker, bei Kältekonservierung eine stärkere Schädigung des Virus. Diese Kolloide bilden schützende Hüllen zwischen den Viruspartikeln und den entstehenden Eiskorpuskeln, so daß schädliche Ionenverschiebungen und Proteindenaturierungen verhindert werden können (HALL-DOR et al. 16).

Es ist anzunehmen, daß nativer Tumorcites die ausgeprägteste kolloidale

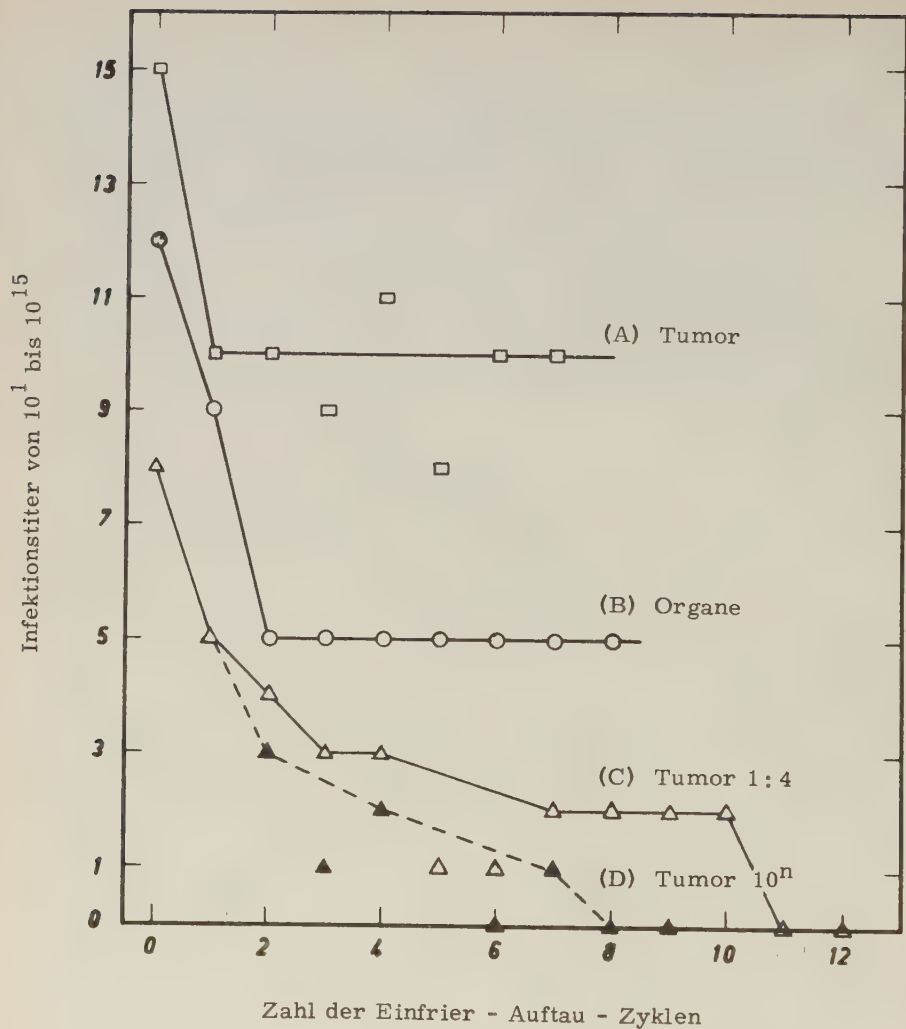


Abbildung 1: Der Aktivitätsabfall des Riley-Virus nach wiederholtem Einfrieren des unverdünnten Tumorscites (A), der erhaltenen Organe Leber und Milz (B), der 1:4 verdünnten Virus-Hanks-Lösung (C) und deren logarithmischen Verdünnungsreihen (D).

Schutzwirkung gibt und deshalb eine bessere Erhaltung der Infektiosität des Riley-Virus erreicht werden kann.

Mit jeder Temperaturerhöhung wächst die Größe der stets vorhandenen Eiskristalle und es kommt zu mechanischen Zerstörungen und Ionenverschiebungen, die weitere Schäden am Korpuskel verursachen. Aus diesen Überlegungen heraus erwärmen wir die Viruslösungen möglichst rasch in einem Wasserbad bei $+37^{\circ}\text{C}$, um diese schädigenden Einflüsse gering zu halten. Es bleibt zu untersuchen, ob das Riley-Virus durch Gefriertrocknung besser konserviert werden kann. Bekannt ist, daß sich Viren dabei unterschiedlich verhalten. So ist die Poliomyelitisgruppe unstabil, während sich Viren der Tollwut, des Gelbfiebers, der Herpesgruppe und das Virus der lymphozytären Choriomeningitis gut konservieren lassen (LEHMANN et al. 19).

Verdünnungs- stufe	Zahl der wiederholten Einfrier- - Auftau - Zyklen								
	0	1	2	3	4	5	6	7	
10^2	130 +	176 +	--	180 +	113 +	120 +	123 +	180 +	
10^3	--	--	--	127 +	113 +	107 +	113 +	103 +	
10^4	146 +	223 +	--	107 +	115 +	127 +	110 +	190 +	
10^5	--	--	116 +	107 +	118 +	97 +	110 +	153 +	
10^6	230 +	166 +	113 +	67 +	122 +	97 +	120 +	103 +	
10^7	--	--	116 +	111 +	138 +	137 +	97 +	176 +	
10^8	163 +	120 +	116 +	111 +	135 +	78 +	124 +	156 +	
10^9	--	--	117 +	90 +	102 +	9	109 +	122 +	
10^{10}	150 +	70 +	100 +	10	119 +	9	89 +	106 +	
10^{11}	--	32	57	56	89 +	23			
10^{12}	170 +	41							
10^{13}	--	40							
10^{14}	166 +								
10^{15}	--								
10^{16}	30								
10^{17}	35								

Tabelle 1 : Der Aktivitätswert wiederholt eingefroren Die Zahlen bedeuten Durchschnitts-Einheiten im Serum von Wirkung mit + angegeben ist.

Tabelle 1 : Der Aktivitätsabfall des in unverdünntem Tumorasces wiederholt eingefrorenen LDH-Virus.
Die Zahlen bedeuten Durchschnittswerte der LDH-Aktivität in Bücher-Einheiten im Serum von Testmäusen, wobei positive Viruswirkung mit + angegeben ist.

Verdünnungs- stufe	Zahl der wiederholten Einfrier - Auftau - Zyklen												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
unverdünn	161 +	190 +	153 +	124 +	140 +	109 +	202 +	111 +	147 +	104 +	113 +	114 +	78 +
10 ¹	--	143 +	183 +	106 +	147 +	91 +	220 +	182 +	129 +	107 +	163 +	22	38
10 ²	--	147 +	105 +	130 +	143 +	34	35	112 +	65 +	60	61	30	
10 ³	--	173 +	--	72 +	93 +	31							
10 ⁴	--	123 +	65 +	31									
10 ⁵	150 +	87 +	32	35									
10 ⁶	120 +	18											
10 ⁷	113 +												
10 ⁸	82 +												
10 ⁹	--												
10 ¹⁰	32												

Tabelle 2: Der Aktivitätsabfall des 1:4 in Hanks'cher Salzlösung verdünnten LDH-Virus nach wiederholtem Einfrieren.
Die Zahlen bedeuten die gemessene LDH-Aktivität in Bücher-Einheiten im Mäuseserum.
Die für Viruswirkung sprechenden Werte sind + bezeichnet.

Verdünnungs- stufe	Zahl der wiederholten Einfrier - Auftau - Zyklen									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10^1	--	143 +	85 +	117 +	173 +	115 +	32	99 +	32	22
10^2	--	147 +	137 +	27	150 +	35	--	17		
10^3	--	173 +	87 +	28						
10^4	--	123 +	51	19						
10^5	150 +	87 +	43	24						
10^6	120 +	16								
10^7	113 +									
10^8	82 +									
10^9	--									
10^{10}	32									

Tabelle 3: Der Aktivitätsabfall des 1; 4 in Hanks'scher Salzlösung verdünnten LDH-Virus nach wiederholtem Einfrieren der logarithmischen Verdünnungsreihen.
Zahlenangaben wie in Tab. 1 und 2

Verdünnungs- stufe	Zahl der wiederholten Einfrier - Auftau - Zyklen									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Ausgangs- material	110 +	--	--	--	--	--	--	125 +	--	
10 ¹	233 +	90 +	77 +	104 +	102 +	132 +	120 +	--	123 +	
10 ²	--	--	--	--	--	160 +	--	62 +	174 +	
10 ³	--	--	--	--	96 +	--	129 +	--	126 +	
10 ⁴	--	--	--	--	--	222 +	111 +	84 +	118 +	
10 ⁵	230 +	--	88 +	103 +	81 +	--	--	--	135 +	
10 ⁶	--	95 +	--	--	--	--	--	--	34	
10 ⁷	150 +	--	21	30						
10 ⁸	217 +	--	--	29						
10 ⁹	72 +	94 +	24	45						
10 ¹⁰	107 +	--	--	64						
10 ¹¹	--	21	22							
10 ¹²	95 +	27	22							

Tabelle 4: Der Aktivitätsabfall
des in Organen Virus-infizierter Mäuse
se enthaltenen LDH-Virus nach mehr-
maligen Einfrieren.

Tabelle 4: Der Aktivitätsabfall
des in Organen Virus-infizierter Mäu-
se enthaltenen LDH-Virus nach mehr-
maligen Einfrieren.
Zahlenangaben wie in Tab. 1 - 3

D., E. VIRUSINAKTIVIERUNG DURCH HITZE, FORMALIN UND NATRIUMDESOXYCHOLAT

Ausgangsmaterial für die Versuche war wieder das Landschütz-Sarkom Sa I. Versuchsmäuse und Methodik der LDH-Bestimmung im Serum wurden früher unter Methode und Material beschrieben.

Das Riley-Virus wurde auf physikalischem Wege durch Hitze (Versuch 5) und auf chemischem Wege durch Formalin (Versuch 6) und Natriumdesoxycholat (Versuch 7) zu inaktivieren versucht.

Virusaktivierung durch Hitze (Versuch 5)

1:4 verdünnte und Seitz-filtrierte Hanks-Virus-Lösung wurde 35 Minuten lang $+65^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt. Dieses hitzeinaktivierte Virus wurde fünf weißen Mäusen intraperitoneal (0,5 ml) injiziert. Die Leerwerte der Versuchstiere lagen zwischen 15 und 30 BÜE. Die Serum-LDH wurde laufend kontrolliert und im Normbereich gefunden. Nach drei Wochen wurde ein zweites Mal hitzeinaktiviertes Virus injiziert. Die bis zur fünfzehnten Woche durchgeführten Serumkontrollen weichen nicht von den Normwerten ab; die LDH-Aktivität pendelte zwischen 15 und 25 BÜE. Lediglich am zweiten Tag nach der ersten Injektion war der LDH-Spiegel vorübergehend erhöht; dies ist als unspezifischer Effekt aufzufassen und nicht auf die Wirkung des Riley-Virus zurückzuführen.

Fünfzehn Wochen nach der Erstinjektion wurden die Tiere mit aktivem LDH-Virus aus Seitz-filtrierte Landschütz-Sarkom, das als 1:4 verdünnte Hanks-Virus-Lösung über viele Wochen in der Tiefkühltruhe bei -24°C konserviert worden war, infiziert. Kurze Zeit darauf konnte eine dreifache Erhöhung der LDH im Serum gemessen werden, die während der fünf Wochen Beobachtungszeit erhalten blieb.

Virusinaktivierung durch Formol (Versuch 6)

Mit 40 % wässriger Formollösung, zur Stabilisierung mit Methanol versetzt, wurde eine 1:4 verdünnte, Seitz-filtrierte Hanks-Virus-Lösung versetzt und auf eine Endkonzentration von 0,5 % Formol gebracht. Die Viruslösung wurde mit Natriumbicarbonatlösung auf pH 7,5 eingestellt, durch einen Schott G 4 - Glasfilter filtriert und bei 30°C 40 Minuten lang inkubiert.

Von diesem Filtrat wurde je 0,5 ml einundzwanzig Mäusen intraperitoneal injiziert. Die Serum-LDH wurde laufend kontrolliert und im Normbereich gefunden. Das Formalin inaktivierte Virus wurde nach drei Wochen ein zweites Mal und nach zehn Wochen ein drittes Mal injiziert. Die LDH-Serumwerte lagen während der fünfzehn Beobachtungswochen ausschließlich im Bereich der Norm.

Fünfzehn Wochen nach der ersten Virusinjektion wurden die Tiere, wie unter Versuch 5 beschrieben, mit aktivem LDH-Virus infiziert. Fünf Tage später war die LDH-Aktivität auf durchschnittlich dreifache Normwerte angestiegen; im Laufe der nächsten acht Wochen erreichte die Serum-LDH vier- bis fünffache Normwerte; bis 115 BÜE.

Virusinaktivierung durch Natriumdesoxycholat (Versuch 7)

Viruslösung (siehe Versuch 5 und 6) wurde mit pulveriger Desoxycholsäure (Merck) versetzt und auf eine Endkonzentration von 0,25 % Natriumdesoxycholat gebracht. Die Viruslösung wurde, wie unter Versuch 6 beschrieben, auf einen pH-Wert 7,5 eingestellt, filtriert und inkubiert. Fünfundzwanzig Mäuse wurden, wie im Versuch 6, mit Desoxycholsäure inaktiviertem Virus und anschließend aktivem Riley-Virus infiziert. Die LDH-Werte weichen nicht von der Norm ab. Nur unmittelbar nach der ersten und zweiten Injektion wurden vorübergehend gering erhöhte LDH-Werte gemessen, die nicht auf die Wirkung des Riley-Virus zurückzuführen sind. Drei Tage nach der aktiven Viruszufuhr war der LDH-Serumspiegel auf fast dreifache Normwerte angestiegen; im Laufe der nächsten zehn Wochen erhöhte er sich auf vier- bis fünffache Normwerte; bis 130 BÜE.

Weiße Mäuse, die zur Kontrolle mit aktiver, 1:4 verdünnter, Seitz-filtrierter und G 5 filtrierter Hanks-Virus-Lösung infiziert worden waren, zeigten drei- bis siebenfach erhöhte LDH-Serumwerte über die sechzehn Beobachtungswochen. Ausserdem wurden virusfreie Mäuse gehalten, deren Serum-LDH während fünfundzwanzig Beobachtungswochen konstant im Normbereich blieb.

Diskussion

Es sollte untersucht werden, ob das Riley-Virus durch thermische Einflüsse und chemische Substanzen, wie Formol und Natriumdesoxycholat, inaktiviert werden kann. Es ist bekannt, daß physikalische Einflüsse und chemische Substanzen reduzierend auf die Infektiosität von Virus ganz allgemein wirken. So setzen extreme Wärmeanstiege, Tageslicht oder UV-Strahlen

die Viruswirkung herab und chemische Verbindungen, wie aromatische Substanzen, Metallverbindungen, reduzierende Stoffe, Antibiotica und Chemotherapeutica reduzieren die Infektiosität (HAAGEN et al. 14).

Das Influenzavirus kann beispielsweise bei -20°C mindestens sechs Monate ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden; bei $+75^{\circ}\text{C}$ wird es in 15 Sekunden zerstört. 1 % Natriumdesoxycholat inaktiviert das gleiche Virus vollständig; 2 % Formalin wirkt innerhalb 10 Minuten viruzid, 0,1 % Formalin zerstört bei $+45^{\circ}\text{C}$ nach einer Stunde die Infektiosität, der HA-Titer hingegen bleibt unverändert.

Das Virus der atypischen Geflügelpest wird durch Formol in niederen Konzentrationen inaktiviert, ohne das HA-Vermögen und die Enzymaktivität wesentlich zu schädigen.

Adenoviren haben eine bemerkenswerte Resistenz gegen äußerliche Einflüsse im Gegensatz zum Mumps- und Influenzavirus. So können Adenoviren mindestens sieben Tage bei $+34^{\circ}\text{C}$ gehalten werden. Das Psittacosevirus hingegen wird innerhalb 30 Minuten bei $+55^{\circ}\text{C}$ inaktiviert; höhere Temperaturen zerstören es. Bei $+4^{\circ}\text{C}$ kann es monatelang infektiös erhalten bleiben. 1-2 % Formol hebt die Pathogenität auf, erhält aber die Antigenität. Oberflächenaktive Substanzen, wie Saponin und Natriumdesoxycholat, welche Viren inaktivieren können, scheinen dagegen ohne Wirkung auf das Psittacosevirus zu sein (HAA-GEN et al. 14).

Diese Beispiele zeigen die unterschiedliche Reaktion von Virusarten auf physikalische und chemische Einflüsse.

Unsere Untersuchungen ergaben erstens, daß die fermentstimulierende Komponente des Riley-Virus durch Temperaturen über $+65^{\circ}\text{C}$ nach 35 Minuten inaktiviert ist. Dabei ist zu bemerken, daß nicht allein die Temperaturhöhe, sondern auch die zeitliche Einwirkung von Bedeutung sind. Zwei Vorversuche ergaben, daß Temperaturen von $+65^{\circ}\text{C}$ während einer Inkubationszeit von 15 - 20 Minuten nicht zur Inaktivierung des Riley-Virus ausreichen.

Zweitens kann die LDH-erhöhende Komponente des Riley-Virus sowohl durch Formol wie durch Desoxycholsäure ausgeschaltet werden. 0,25 % Natriumdesoxycholsäurelösung und 0,5 % Formalinlösung bewirken einen Verlust der Infektiosität und Vermehrungsfähigkeit des Riley-Virus. Daraus ist zu schließen, daß sowohl Lipidlösungsmittel wie auch Proteindenaturierungsmittel das Riley-Virus inaktivieren. Dies ergab sich auch aus Untersuchungen, wo isolierte RNS, DNS oder RNS/DNS aus LDH-Virus ohne Wirkung auf die Serum-LDH beimpfter Mäuse blieb (BRDICZKA et al. 5, GEORGII et al. 13). Am Aufbau der fermentstimulierenden Komponente scheint demnach ein Lipidproteidkörper beteiligt zu sein.

Mit den hier angewandten Versuchsbedingungen ist es nicht möglich, eine Immunisierung mit chemisch und thermisch inaktiviertem Riley-Virus zu erreichen. Viren enthalten antigene Komponenten, aber bei nicht allen Virusarten ist eine Neutralisationsreaktion, d.h. echte Virus-Antikörper-Reaktion, gelungen. Der Ablauf wird bestimmt durch veränderliche und nicht veränderliche Faktoren, wie Antikörperkonzentration, Viruskonzentration, Temperatur und pH-Wert. Unter Umständen sind mehrere antigene Komponenten vorhanden, wie z.B. V- und S-Antigene bei Myxo-, Polio-, Arbor- und Adenoviren, die unterschiedlich auf physikalische Einflüsse und chemische Substanzen reagieren (HAAS et al. 15).

Bei unseren Versuchen bleibt offen, ob ein Antikörper-Bildungsfaktor der Maus innerhalb fünfzehn Wochen entstehen kann; weiterhin ist es fraglich, ob eine 0,5 % Formollösung noch eine weitgehende Schonung der antigenen Substanz gewährleistet oder ob bereits die Pathogenität und Antigenität verlorengegangen sind.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Abschnitte gegliedert.

Einmal wurde die Kältekonservierung des Riley-Virus mit der Wirkung wiederholten Einfrierens und Auftauens auf das Virus untersucht. Zum anderen wurde die Inaktivierungsmöglichkeit durch Hitze, sowie durch chemische Substanzen, wie Formol und Natriumdesoxycholat, untersucht und deren immunisierende Wirkung an Mäusen geprüft.

1. Kälteempfindlichkeit

In fortlaufenden Einfrier-Auftau-Zyklen von Riley-Virus fand sich folgendes Verhalten der Virusaktivität des im Gewebe oder in Salzlösungen enthaltenen Agens.

Riley-Virus im nativen Tumoraszites wird durch einmaliges Einfrieren auf -24°C in seiner Infektiosität um fünf Zehnerpotenzen von 10^{15} auf 10^{10} abgeschwächt. Danach folgende Einfrier-Auftau-Zyklen bis siebenmal beeinträchtigen den Infektionstiter nicht mehr. Riley-Virus in den Organen Leber und Milz wird durch das erste Einfrieren um vier Zehnerpotenzen von 10^{12} auf 10^9 bzw. 10^5 abgeschwächt. Die dann folgenden Einfrier-Auftau-Zyklen reduzieren den Infektionstiter auch bei siebenmaliger Wiederholung nicht mehr.

Riley-Virus in verdünnter Salzlösung verhält sich gegenüber der Kälteeinwirkung etwas anders. Es verliert nicht nur durch den ersten und zweiten, sondern auch durch alle folgenden Einfrier-Auftau-Zyklen jeweils mindestens eine Zehnerpotenz seiner Infektiosität, so daß schließlich das Virus durch die Kälte inaktiviert worden ist. Daraus ergibt sich, daß nativer Ascitestumor die günstigste Aufbewahrungsform für Riley-Virus bei -24°C ist. Ähnlich verhält sich das in den Organen Leber oder Milz eingefrorene Riley-Virus, während das in reiner Salzlösung enthaltene Virus durch die Kälte am raschesten inaktiviert wird.

2. Inaktivierungsmöglichkeit

Die LDH-erhöhende Komponente des Riley-Virus wird durch Temperaturen über $+65^{\circ}\text{C}$ innerhalb 35 Minuten aufgehoben. Nicht nur die Temperaturhöhe, sondern auch die zeitliche Dauer der Temperatureinwirkung ist für die Inaktivierung des Riley-Virus maßgebend. Chemische Substanzen, wie Formol oder Natriumdesoxycholat, heben in Konzentrationen von 0, 5 % bzw. 0, 25 % die LDH-erhöhende Komponente des Riley-Virus auf.

Mit den hier angewandten Methoden der Virusinaktivierung konnten weiße Mäuse nicht gegen Riley-Virus immunisiert werden. Weder hitzeinaktiviertes noch Formol- oder Natriumdesoxycholat-inaktiviertes Virus verursachten eine Immunität gegen die LDH-erhöhende Komponente des Riley-Virus.

G. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAMS D.H., ROWSON K.E.K. and SALAMAN M.H. :
The effect of tumors, of Leukemia and of some viruses associated with them on the plasma lactic dehydrogenase activity of mice.
Brit.J.Cancer 15, 860 (1961)
2. BAYERLE H., GEORGII A. u. RICHARD K.E. :
Über die Aktivität von Serumfermenten nach zellfreier Beimpfung mit Ehrlich'schem Mäusetumorascites.
Klin. Wschr. 40, 920 (1962)
3. BLADEN jr. H. A. and NOTKINS A. L. :
Electron microscopic demonstration of the lactic dehydrogenase agent.
Virology, 21, 269
4. BLANCHER M. C., GREEN P. T., MAC LEAN J. P. and HOLLENBERG M. J. :
Plasma lactic dehydrogenase and phosphohexoisomerase in leukemia.
Blood 13, 245 (1958)
5. BRDICZKA D., GEORGII A. u. ZOBL H. :
Die Wirkung von Nucleinsäuren aus virushaltigen Mäusegeschwülsten auf die Lactatdehydrogenaseaktivität im Blutserum.
Naturwissenschaften 50, 306 (1963)
6. DÖHNER L. :
Quantitative Untersuchungen zur Konservierung menschlicher Zellen bei tiefen Temperaturen.
Arch. Virusforsch. 3, 454 (1962)
7. FRIEND C. and WROBLEWSKI F. :
Lactic dehydrogenase activity of serum in mice with transplanted Leukemia.
Science 124, 173 (1956)
8. GEORGII A. :
Die Aktivitätsänderung im Serum nach Infektion mit Geschwulstvirus der Maus als Regulationsstörung in vivo.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 46, 357 (1962)

9. GEORGII A. :
Über das Lactatdehydrogenase erhöhende Virus in Laboratoriumsgeschwülsten;
Klin. Wschr. 42, 559 (1964)
10. GEORGII A., BAYERLE H., BRDICZKA D. u. ZOBL H. ;
Über ein die Lactatdehydrogenase im Serum aktivierendes Virus aus Geschwülsten der Maus.
Z. Krebsforsch. 65, 334 (1963)
11. GEORGII A., JÄGER M., KROTH H. u. BAYERLE H. :
Aktivitätsänderungen der Lactatdehydrogenase im Mäuseplasma durch Beimpfung mit virushaltigen Geschwulstfiltraten oder virushaltigen Gewebekulturen.
Experientia (Basel) 18, 71 (1962)
12. GEORGII A., KROTH H. u. BAYERLE H. ;
Weitere Untersuchungen über die Aktivierung der Lactatdehydrogenase im Serum durch Geschwulstvirus der Maus.
13. GEORGII A., GOLDBRUNNER P. u. BRDICZKA H. :
Der Einfluß von p-Aminosalicylat bei der Nucleinsäureisolierung auf das Lactatdehydrogenase aktivierende Virus des Mäusetumors Sarkom I.
Naturwissenschaften, 51, 66 (1964)
14. HAAGEN E. ;
Viruskrankheiten des Menschen, Band I
Dr. D. Steinkopf Verlag, Darmstadt (1964)
15. HAAS R. :
Erkrankungen durch Viren.
Lehrbuch der medizin. Mikrobiologie u. Infektionskrankheiten.
(H. Reploh, H. J. Otte)
G. Fischer Verlag Stuttgart (1961)
16. HALLDOR Th. :
Stability of Visna-Virus in infectious tissue culture fluid.
Arch. Virusforsch. 4, 501 (1961)
17. HESS B. u. WALTER S. J. :
Absorptions-Methode zur Differenzierung der Lactatdehydrogenase sowie anderer löslicher Fermente und Proteine im Serum und in Geweben.
Klin. Wschr. 39, 213 (1961)

18. HILL B.R. and JORDAN R. T. :
Serum lactic dehydrogenase activity in mice with transplantable Leukemia.
Canc. Res. 17, 144 (1957)
19. LEHMANN-GRUBE F. :
Untersuchungen zur Wärmestabilität des Virus der lymphozytären Chorio-
meningitis.
Arch. Virusforsch. 1, 56 (1960)
20. LENTA S. M. P. and RIEHL S. M. A. :
Dehydrogenase studies of tissue from normal and tumor-bearing mice.
II. Lactic and malic dehydrogenase.
Canc. Res. 9, 47 (1949)
21. LÖBLICH u. LANDSCHÜTZ :
Vergleichende elektronenoptische Untersuchungen am Ehrlich- und Sa I-
Ascitestumor.
Krebsforsch. 63, 269 (1960)
22. MAHY B. W. , PARR C. W. and ROWSON K. E. K. :
Increased plasma isomerase and transaminase activity in mice infected
with lactic dehydrogenase-elevating virus.
Nature (London) 198, 885 (1963)
23. MORGAN J. F. , GUERIN L. F. and MORTON H. J. :
The effect of low temperature and storage on the viability and mouse
strain specificity of ascitic tumor cells.
Canc. Res. 16, 907 (1956)
24. NOTKINS A. L. , BERRY R. J. , MOLONEY J. B. and GREENFIELD R. E. :
Relationship of the lactic dehydrogenase factor of certain murine tumors.
Nature (London) 193, 79 (1962)
25. NOTKINS A. L. , GREENFIELD R. E. , MARSHALL D. and BANE L. :
Multiple enzyme changes in the plasma of normal and tumor-bearing
mice following infection with the lactic dehydrogenase agent.
J. exp. Med. 117, 185 (1963)
26. PLAGEMANN P. G. W. , WATANABE B. and SWIMM H. E. :
Plasma lactic dehydrogenase elevating agent of mice: Effect of levels of
additional enzymes.
Proc. Soc. exp. Biol. (New York) 111, 749 (1962)

27. RAUEN H. M. u. HUPE H. :
Das Lactatdehydrogenase-Agens im Blute tumortragender Mäuse.
Arzneimittelforsch. 13, 1933 (1963)
28. RILEY V., HUERTO E., LOVELESS J.D., BARDELL D., FITZMAURICE M.
and FORMAN C. :
Role of viruses in the biochemical and pathological behaviour of tumor
and host.
VIII. Int. Canc. Congr. Moscow (1962)
29. RILEY V., HUERTO E., LILLY F., BARDELL D., LOVELESS J.D. and
FITZMAURICE M. A. :
Some characteristics of virus-like entities associated with thirty varieties
of experimental tumors.
Proc. Amer. Ass. Canc. Res. 3, 261 (1961)
30. RILEY V., HUERTO E., LOVELESS J.D., BARDELL D., FITZMAURICE F.
and FORMAN C. :
Inapparent transmissible agents in oncology and their influence on tumor
and host.
Acta Un. Int. Canc. 19, 263 (1963)
31. RILEY V., LILLY F., HUERTO E. and BARDELL D. :
Transmissible agent associated with 26 types of experimental mouse
neoplasms.
Science 132, 545 (1960)
32. RILEY V., LOVELESS J.D., FITZMAURICE M. and EIDINOFF M.L. :
Preliminary studies on size of lactic dehydrogenase elevating virus-like
agents.
(Im Druck)
33. ROWSON K.E.K., ADAMS D.H. and SALAMAN M.H. :
Riley's enzyme elevating virus; A study of the infection in mice and its
relation to virus induced Leukemia.
VIII. Int. Canc. Congr. Moscow (1962)
34. ROWSON K.E.K., MAHI B.W.J. and SALAMAN M.H. :
Size estimation by filtration of the enzyme elevating virus of Riley.
Life Sci. 7, 479 (1963)
35. SWIM H.E., HAFF R.F. and PARKER R.F. :
Canc. Res. 18, 711 (1958)

36. WARNOCK M. L. ;
Isozymic patterns in organs of mice infected with LDH-agent.
Proc. Soc. 2, 448 (1964)
37. VEEN I. v. d. and MES A. ;
Perservation of human cell strains and of tissues by freezing.
Arch. Virusforsch. 8, 239 (1958)

ADDENDUM

Der Autor bedankt sich bei

Herrn Professor Dr. A. HERRLICH, Direktor der Bayerischen Landesimpfanstalt und Herrn Dr. MUNZ von der Bayerischen Landesimpfanstalt für die Überlassung des Vaccine-Virus zur Immunisierung der Mäuse gegen Ektromelie-Virus;

Herrn Dr. SCHÄFER vom Hygiene-Institut der Universität München für wertvolle Literaturhinweise.

Herrn Priv. -Doz. Dr. A. GEORGII vom Pathologischen Institut der Universität München danke ich für die Anregung zu der Arbeit und für die Beratung bei der Durchführung der Arbeiten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Sachmittelbeihilfe im Rahmen des Forschungsvorhabens Ge 121/2 und Ge 121/3.

LEBENS LAUF

Am 2. XI. 1936 bin ich als Sohn katholischer Eltern, des kaufmännischen Geschäftsführers Leonhard Prectel und seiner Ehefrau Margarete, geb. Maurer, als ältester von drei Geschwistern in Augsburg geboren.

Nach der Volksschule und der höheren Schule (Humanistisches Gymnasium und Realgymnasium) erhielt ich 1957 am Realgymnasium Augsburg das Reifezeugnis.

Von Herbst 1957 bis Frühjahr 1963 studierte ich Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die ärztliche Prüfung wurde am 10. VII. 1963 mit der Gesamtnote gut beendet und die Zulassung als Medizinalassistent erteilt.

Am Pathologischen Institut der Universität München war ich als Medizinalassistent von September 1963 bis Juli 1964 tätig. Seit September 1964 bin ich an der Medizinischen Poliklinik der Universität München.

Die vorgelegte Dissertation wurde während meines Studiums begonnen und im wesentlichen während der Medizinalassistentenzeit am Pathologischen Institut ausgeführt.

